

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭63-502117

⑬ 公表 昭和63年(1988)8月18日

⑭ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分) 3(2)
A 61 K 9/10	3 2 7	A-6742-4C			
// A 61 K 37/24		M-6742-4C			
B 01 J 13/02		8615-4C			
		Z-8317-4G			

(全 14 頁)

⑯ 発明の名称 放出を制御されたリボソーム供給系

⑰ 特 願 昭62-501773

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)10月12日

⑲ 出 願 昭62(1987)2月9日

⑳ 国際出願 PCT/US87/00285

㉑ 国際公開番号 WO87/04592

㉒ 国際公開日 昭62(1987)8月13日

優先権主張 ㉓ 1986年2月10日 ㉔ 米国(U S) ㉕ 828153

⑳ 発 明 者 ヨウーヤン, アニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア ロス アルトス, アネット レ
ン 1983㉑ 出 願 人 リボソーム テクノロジー, イ
ンコーポレイテッドアメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メンロ パーク, ハミ
ルトン コート 1050

㉒ 代 理 人 弁理士 山本 秀策

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), GB(広域
特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

請求の範囲

1. リボソーム不透過性化合物を捕捉した形で含むリボソームの懸濁液を形成し、該懸濁液を筋肉内部位または皮下部位に注射することによって該化合物を投与する際に、該注射部位から血流への該化合物の放出割合を選択的に増加させる方法であって、

該部位に注射されたリボソームの平均サイズを選択的に増加させること、および

該部位に注射されたリボソーム懸濁液の量を選択的に増加させること、

を包含する方法。

2. 前記化合物がカルシトニン、成長ホルモン、インシュリン、インターフェロン、およびインターロイキン-2である群から選択されたペプチドである、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. ホルモンがカルシトニンであり、該ホルモンが懸濁液のリボソーム中に少なくとも約0.10~1.0mg/mlの濃度で被包されている、請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記リボソームに対して、負に荷電したリン脂質の量を減少させて、前記注射部位からの前記化合物の放出割合を増加させることを、さらに包含する、請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記捕捉された化合物を含む前記リボソームの平均サ

イズが約0.2ミクロンより小さく、そして平均サイズが約0.5ミクロンより大きな空のリボソームの添加量を増加させることによって、前記注射されたリボソームの平均サイズが選択的に増加される、請求の範囲第1項に記載の方法。

6. リボソーム不透過性化合物を筋肉内注射部位または皮下注射部位から血流へ投与する際に用いるリボソーム組成物であって、

該化合物を捕捉した形で含む、平均粒子サイズが約0.3ミクロンより小さなリボソームの水性懸濁液、および

このような注射部位からの該化合物のクリアランス半減期を、所望の半減期である約1~14日にまで延長するのに有効な量で該懸濁液中に含まれる、ある量の空のリボソーム、

を含有する組成物。

7. 前記空のリボソームの平均粒子サイズが約0.5ミクロンより大きい、請求の範囲第6項に記載の組成物。

8. 前記化合物がカルシトニン、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロン、およびインターロイキン-2である群から選択されたペプチドである、請求の範囲第6項に記載の組成物。

9. ホルモンがカルシトニンであり、前記リボソームの被包空間内のホルモン濃度が少なくとも約1mg/mlである、請求の範囲第8項に記載の組成物。

10. 前記リボソームがオートコファロールを少なくとも約0.2モル%の量で含む、請求の範囲第6項に記載の組成物。

11. リボソームカルシトニン組成物であって、
少なくとも約 0.2モル%のα-トコフェロールを含むリボソーム 無菌水性懸濁液、および
該リボソームに捕捉され、該リボソームの被包空間内の濃度が少なくとも約1mg/mlであるカルシトニン、
を含有する組成物。
12. 前記リボソームが約5～100モル%の間のホスファチジルグルセロールを含む、請求の範囲第11項に記載の組成物。
13. 前記リボソームの平均サイズが少なくとも約0.3ミクロンであり、そして前記組成物を筋肉内部位または皮下部位に注射した場合に、血流へのカルシトニン放出の半減期を増加させるのに有効な量で、さらに空のリボソームを含む、請求の範囲第11項に記載の組成物。
14. 前記空のリボソームの平均サイズが少なくとも約0.5ミクロンである、請求の範囲第13項に記載の組成物。

口投与される化合物について、リボソームは、長期間にわたって制御された「封入物」の放出を供給し、そして血液中の毒物化合物の血液ピークレベルを制限することにより毒性のある副作用を抑える力を有する。これらの兼ね備えられた長所は、化合物をより少ない回数およびより高い投与量レベルで投与することを可能としており、それによって治療の便利さが増す。

経口投与のために広く提案されているリボソーム投与の経路の1つに、静脈内(IV)注射がある。この経路によって投与されるリボソームは、一般に細胞内皮系(RES)により除去され(cleared)。その結果、リボソームは RES細胞に富む肝臓、脾臓および肺のような器官に集中する傾向がある。リボソームを RESに富む組織にある適度特異的にみちびく能力は、例えば、肝臓、脾臓または肺の病気の治療に対して有利である。この方法は、例えば、米国特許出願「リボソーム/アントラキノン薬剤の組成物および方法」(1985年12月6日出願の特許出願第806084号)に記載されている。この特許出願には、リボソームに捕捉されたドキソルビシンによる肝臓癌の治療のための改良された治療法を開示している。しかし、投与すべき化合物を RESに富む組織以外の部位に用いようとする場合、特にもし血流への長期間の放出が必要とされるときには、IV投与はしばしば使用が限定される。

リボソームに捕捉された化合物の筋肉内(IM)または皮下(SQ)投与もまた、提案されている。この方法は、リボソ-

放出を制御されたリボソーム供給系

1. 発明の分野

本発明は、リボソームを基本とする系および制御された速度で血流へ薬物学的に活性な化合物を供給するため 方法に関する。

2. 参照文献

1. Abra, R.H., 他, Res Connect Chem Path and Phys, 37:199 (1982).
2. Fukunaga, M., 他, Endocrinology, 115(2):757 (1985).
3. Greenwood, P.C., 他, Biochem J, 89:114 (1963).
4. Jackson, A.J., Drug Metab and Dispos, 9(6):535 (1981).
5. McParlane, A.S., Nature, 182:53 (1958).
6. Sacka, F., Jr, Proc Nat Acad Sci, USA, 75:4194 (1978).
7. Sacka, F., Jr, Ann Rev Biophys Bioeng, 9:467 (1980).

3. 発明の背景

リボソーム供給系が、薬剤やベプテドホルモンのような、種々の薬物学的活性な化合物について提案されている。非経

ムが注射部位に存在する限り、RES による迅速な取り込みと除去(クリアランス: clearance)はおこらないという利点を有する。注射部位に固定されたリボソームは、その後捕捉された化合物を長期間にわたって血流へ放出することができる。その例として、英国特許出願第 2,050,287号には、SQ注射部位からインシュリンをゆっくりと放出するために意図されたリボソーム系が開示されている。ごく最近、IM投与部位からのリボソームに被包されたカルシトニン放出のための系が提案されている(Fukunaga)。

前述のタイプのIMまたはSQ放出系においては、注射部位からのリボソームに捕捉された化合物の放出速度を制御できることが望ましいであろう。しかし、注射部位からの薬剤放出速度に影響する変数を理解し、制御しようとする従来技術の試みは、限られた成果しかあげていない。これらの研究の質の低さの原因の1つは、捕捉された化合物のリボソームからの放出に影響する因子から、注射部位におけるリボソームの分解速度および/または放出速度に影響する因子を分離するという問題である。例えば、もし、リボソーム透過性薬剤が研究されるならば、血流中への薬剤放出速度と、注射部位でのリボソームの安定性とはほとんど独立した関係であり得る。

今日までに報告されているひとつの研究においては、IM注射部位からのリボソームに捕捉されたインシュリンの放出における、いくつかのリボソームの変数の効果が調べられている(Jackson)。その結果の概略は次のとおりである:(a)より

小さいリボソーム (0.15 ~ 0.7 ミクロン) は、より大きいリボソーム (0.3 ~ 2.0 ミクロン) よりも、リンパ液によってより迅速に取り込まれる；そして注射されたリボソームの総量が減少するにつれ、注射部位からリボソームの吸収はより速くなる。これらの結果、どちらも、次の事項を予測していない。つまり注射部位へ投与されたリボソームから、リボソーム非透過性の物質 (例えばペプチド) が放出される速度をどのようにして制御するのか、ということも予測していない。さらに、ヒトの治療に使用するために、どのくらい大きなリボソームが凍結された形で調製され得るのか、ということも明らかではない。

4. 発明の要約

それゆえ、注射部位からのリボソーム非透過性化合物の放出速度を、選択された方法で制御するための系と方法とを提供することが、本発明の一層の目的である。

本発明の他の目的は、ヒトに注射または投与するのに適した無菌的な形で容易に調製し得る、そのような系を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、制御された放出速度での非経口的なホルモンの供給に用いられる、安定なリボソーム/ペプチドホルモン組成物を提供することである。

本発明は、血液へのリボソーム非透過性化合物の放出速度を選択的に増加させる方法を含む。その化合物は、該化合物

を捕捉する形態で含有するリボソーム懸濁液を形成し、注射または注射部位へこの懸濁液を注射することにより投与される。注射部位からの物質の放出速度は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズやリボソーム懸濁液の総注射量を増加することにより、選択的に増加する。カプセル化された物質は、インシュリン、成長ホルモン、カルシトニン、インターフェロン、インターロイキン-2 などのペプチドでありうる。このペプチドは、制御された速度で数日間にもわたり血液中へ有利に放出される。

リボソームに被包された物質の放出速度もまた、リボソームの脂質組成を変えることにより制御され得る。ホスファチジルグリセロール (PG) のような、負に荷電したリン脂質は、放出速度を減少するように作用し、コレステロールは速度を増加するように作用する。

ひとつの実施態様においては、リボソームは次の方法により調製される：まず、化合物をカプセル化した小さなリボソームの懸濁液を調製し、該懸濁液の中からカプセル化されていない化合物を除去し、その懸濁液を凍結凍融し、そして、所望のリボソームの平均サイズおよび濃度になるまで、この懸濁液に無菌的に調製した空のリボソームを加える。小さなリボソームは約 0.3 ミクロンを下まわるサイズが好適であり、空のリボソームは 0.5 ミクロンかそれ以上が好適である。

本発明はまた、注射または注射部位からの血液へのリボソーム非透過性化合物の投与のためのリボソーム組成物を包含

する。この組成物は、物質を捕捉した形態で含有し、粒子のサイズの平均が約 0.3 ミクロンを下まわるリボソーム、およびこのような注射部位からの物質の除去の半減期を約 1 ~ 14 日の間の所望の半減期へと増加させるのに有効な量の空のリボソームを有する、リボソームの懸濁液を含む。空のリボソームのサイズ、脂質組成、および相対量は、注射部位からカプセル化された物質が所望の放出速度で供給されるように選択される。

さらに他の面では、本発明はリボソーム/カルシトニン (CT) 組成物を含む。この組成物は、少なくとも約 0.2 モルパーセントのオートコフェロールを含有する被包されたリボソーム懸濁液、およびリボソームの被包空間に少なくとも 0.1 ~ 1 mg/μl の濃度でリボソームに捕捉された CT を含む。その組成物は、懸濁液中に存在する第二鉄の量よりも過剰のモル量でフェリオキサミンが存在することによりさらに安定化しうる。

本発明のこれらおよびその他の目的と特徴は、次の本発明の詳細な記述を添付した図とともに読むと、より十分あきらかになるであろう。

図面の簡単な説明

第 1 図は、空の脂質およびペプチドを被包する脂質の両方を含むリボソーム組成物の調製に用いられる、加工方法の流れ図である；

第 2 図は、注射部位からのリボソームのトレーサー物質の放出のカイネティクス (Kinetics) (丸印)、および注射された動物から分泌されるトレーサーの蓄積 (三角印) を示す；

第 3 図は、第 2 図のトレーサー放出データ (破線)、および小さいサイズのリボソームを有するリボソーム組成物からの類似のトレーサー放出データ (実線) の片対数プロットである；

第 4 図は、注射部位からのカプセル化された放射活性カルシトニン (CT) の放出のカイネティクス (丸印)、動物から分泌されるホルモンの蓄積 (三角印)、および注射部位からの遊離 CT の放出 (四角印) を示す；そして、

第 5 図は、第 4 図からの CT 放出データの片対数プロットである。

発明の詳細な説明

1. リボソーム組成物の調製

A. 脂質成分

組成物中のリボソームは、極性的な小胞形成性脂質から形成される。その脂質は、通常、中性および負に荷電したリン脂質、およびコレステロールのようなステロールを含む。脂質の選択には、通常、次の事項が考慮される：(a) 所望のリボ

ソームサイズおよびリボソームのサイズ調整の容易さ、およびリボソーム注射部分からの脂質およびホルモンの放出速度。

典型的には、リボソーム中 主要な脂質成分はホスファチジルコリン(PC)である。種々の長さおよび飽和度を有する種々のアシル鎖を持つPCが入手可能で、もしくは既知 方法により単離または合成され得る。一般には、ほとんど飽和していないPCがより容易にサイズ調整される。特に濾過装置の用途のため、リボソームが約0.3ミクロンを下まわるサイズに調整されなければならないときにはそうである。サイズ調整に用いられる方法および濾過装置用リボソームは以下に述べられる。アシル鎖の飽和効果は、リボソームが静脈内に投与される場合よりは、薬剤放出速度に影響を与えないようであるが、リン脂質のアシル鎖組成はまた、リボソーム脂質および捕捉された化合物の注射部位からの除去速度に影響を与え得る。1つの好ましいPCは、卵の脂質に由来する卵 PC(EPG)であり、これは、飽和および不飽和のアシル鎖の混合物を含む。

本発明に基いて行い、以下の実施例ⅢおよびⅤで報告されている実験は、次の事例を示す。つまり、負に荷電したリン脂質は、PC単独もしくはPC/コレステロール混合物から生成したリボソームと比べると、脂質および捕捉されている化合物の注射部位からの除去速度を有意に増加させるということを示す。この研究では、選択されたモル比のPGを用い

て生成するリボソームを含むが、ホスファチジルセリン(PS)およびホスファチジルイノシトール(PI)のような負に荷電した他のリン脂質も使用することが可能であった。観察されるPGの効果は、部分的には、自然に起こるリボソームの会合を阻止する荷電性 脂質の能力に関係するようである。実施例Ⅳに報 述するように、1ミクロン孔径のポリカーボネート膜を通して押出すことによりサイズ調整した後にリボソームのサイズを測定すると、PGを含むリボソームが約1ミクロンという安定なサイズを有する。これに対して、PCのみを含むリボソームは、約3~5ミクロンの間の粒子サイズを有することが示される。以下に見られるように、そして本発明方法の1つの重要な実施態様によれば、より大きなリボソームサイズが、注射部位においてより長い薬剤の放出を示す。

実施例ⅣおよびⅤで示される事実は、負に荷電したリン脂質もまた、リボソームのサイズに関係しない機構により、そのままで脂質および薬剤の放出を増加させ得ることを示す。簡単に述べれば、純粋なPG(プラス少量のα-トコフェロール)を含むリボソームについては、PGを5または10モルパーセントの割合のみで含む同様のサイズのリボソームよりも、脂質トレーサーおよび放射標識されたカプセル化ベアチドが、速く除去されることが示された。種々のアシル鎖成分を有し、負に荷電したリン脂質が入手され得る。1つの好ましい脂質は卵PG(EPG)であり、これは飽和および不飽和のアシル鎖部分の混合物を含む。

添加されたコレステロールの、薬剤と脂質との放出(注射部位からの)におよぼす影響もまた調べられた。一般に、コレステロールはリボソームの安定性を増加させることが知られており、そのため、注射部位からの脂質および捕捉された成分の除去に要する時間を増加させることが期待され得る。実施例Ⅴで報告されるように、約6:4のモル比でPCおよびコレステロールを含むリボソームは、純粋なPCリボソームよりも、被包されたベアチドの放出時間が約20%長くなることが示された。しかし、PGを含むリボソームにコレステロールを加えても、脂質またはカプセル化されたベアチドの注射部位からの放出速度には、ほとんど変化がなかった。

B. 保護剤

リボソームの脂質成分は、過酸化および遊離ラジカル反応を促進することが知られている。これらの反応はリボソームの分解を促進する。この問題は、「アントラキノン/リボソーム組成物および方法」という上記の特許出願において充分に述べられている。簡単に述べれば、その出願には、脂質の過酸化反応および遊離ラジカルによる損傷によりリボソーム/薬剤組成物中の脂質および捕捉されている薬剤成分の両方が劣化すると報告されている。脂質および薬剤成分に対する遊離ラジカルによる損傷の程度は、α-トコフェロール(α-T)のような親油性の遊離ラジカル消去剤が小胞を形成している脂質中に含まれていると、有意に減少した。興味あるこ

とに、脂質損傷および薬剤修飾における有意の減少が、次の場合に観察された。つまり、脂質/薬剤組成物が、α-T、およびフェリオキサチミンのような水溶性の鉄特異的キレート剤の両方の存在下において処方された場合に、観察された。フェリオキサチミンは6配位で鉄イオンに強固にキレート結合し得るので、その化合物は、リボソーム懸濁液の水相で、鉄触媒による過酸化を阻止するように作用し得る。2つの保護剤の効果は共に、次の事例を示唆する。つまり、水相で起こる鉄触媒による過酸化反応、および遊離ラジカル反応(脂質相で増強される)の両者が、脂質の過酸化反応の損傷に対して重大に寄与する、ということを示唆する。

この組成物に用いられる親油性の遊離ラジカル消去剤は、好ましくはα-T、もしくは薬学的に許容され得る類似物またはそれらのエステル(例えば、コハク酸α-トコフェロール)である。その他の遊離ラジカル消去剤には、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、没食子酸プロピル(Aegustin)、およびそれらの薬学的に許容され得る塩および類似物が包含される。リボソーム中で、効果的なレベルで、ヒトに経口投与し得る付加的な親油性の遊離ラジカル消去剤がまた、リボソーム内の効果的なレベルで使用され得る。この遊離ラジカル消去剤は、典型的には、従来の手法によりリボソームを調製するのに用いられている脂質成分に含まれる。保護化合物の好ましい濃度は、リボソームを構成する全脂質成分の約0.2から2モルパーセントの間である。しかし、より高濃

度の化合物(特に α -Tまたはそのコハク酸エステル類似物)が、リボソームの安定性に適合し、薬学系に受容される。

水溶性の鉄 異的キレート剤は、天然および合成のトリヒドロキサミン酸のクラスより選択される。このキレート剤は、第2鉄イオンに対する非常に高い結合定数(10^{12} のオーダー)で、そして、2価の陽イオン(例えば、カルシウムおよびマグネシウム陽イオン)に対して比較的低い結合定数を有することによって特徴づけられる。種々の天然起源のトリヒドロキサミン酸が知られている。それらには、フェリクロム、フェリクロムA、およびアルボマイシンのようなフェリクロムクラスの中の化合物;フェリオキサミンおよびフェリオキミンを含むフェリオキサミンクラスの化合物;そしてフアルアミンのクラスの化合物が含まれる。

1つの望ましいキレート剤はフェリオキサミンBであり、このフェリオキサミンBは、また、フェリオキサミン、デスフェリオキサミン、デスフェリオキサミンBおよびDesferalTMとして知られている。この化合物は例外的な鉄結合親和性を示し、鉄貯蔵疾患や鉄中毒の治療でヒトに対して経口の用途では安全であることが実証されている。

上記キレート剤は、リボソーム懸濁液中に第2鉄が過剰である濃度で、組成物中に存在する。典型的には、リボソームの調製に用いられる水性の媒体は少なくとも約1~2 μ Mの第2鉄を含み、そして、100 μ Mまたはそれ以上の第2鉄を含有し得る。約20 μ Mまでの鉄を含む水性の媒体には、約

50 μ Mのキレート剤の濃度が好ましい。

キレート剤は、好ましくは、リボソーム形成時に小胞を形成する脂質に加えられ、それにより、リボソーム調製中に、薬剤により促進される脂質の酸化的損傷から脂質が保護される。キレート剤の水溶性性を加えることによるリボソームの調製方法は以下に記載される。ここでは、次の事項がわかる。つまり、この方法で形成されたリボソーム懸濁液のみが、キレート剤を、大部分を占める水相に、そして、カプセル化された形(つまり水性のリボソーム内部領域)の両方に含む、ということがわかる。あるいは、キレート剤は、リボソームの形成後、懸濁液中に含有され得る。

C. 増進された化合物

リボソームに増進された化合物は、リボソーム不透透性の薬剤またはペプチドである。そのリボソーム外への拡散速度は、1H注射部位でのリボソームの通過速度よりも実質的に高くない。その試薬は、親油性薬剤またはホルモン、または水溶性の薬剤またはペプチドであり得る。上記親油性の薬剤またはホルモンは、その油/水の分配が著しくリボソームの2重層の相方に傾いており、上記水溶性の薬剤またはペプチドは、リボソーム2重層を通過して(拡散することがあったとしても)、ゆっくりと拡散させることが可能である。リボソーム外へ自由に拡散でき、半減期が数時間を下まわる水溶性の薬剤は、本発明からは特に除外する。

ペプチドホルモンおよび免疫的活性化剤は、本発明で用いる化合物の1つの重要なクラスである。代表的なペプチドホルモンには、インシュリン、成長ホルモン、およびカルシトニン(CT)が含まれ、これらは、カルシウムの血中レベルを制御する。インターフェロンおよびインターロイキン2は免疫的活性化剤の代表である。本発明によれば、選択されたペプチド化合物をゆっくりとした制御された速度で数時間から数日間にわたり血流中へと放出することが可能となる。そのため、遊離ホルモンの投与に特徴的である血中ペプチドレベルの大きな変動が回避される。

さらに、そして本発明における1つの発見によれば、ペプチドが比較的低濃度で存在している場合には、キャリアリボソームは、貯蔵にあたって該ペプチドの安定性を有意に増強し得る。実施例IIに報告する実験は、遊離型のCTの安定性が、CT濃度が0.010 μ g/ μ lから1.0 μ g/ μ lに上昇すると、数倍増強されたことを示す。リボソームに比較的高い濃度(例えば1 μ g/ μ l)でカプセル化されており、しかし大部分を占める相の濃度が比較的低い(例えば、0.010 μ g/ μ l)状態で存在するCTは、高濃度の遊離のホルモンで見られるのと同等の安定効果を示す。従って、本発明によれば、高濃度でより安定であるCTのようなペプチドホルモンが、比較的低濃度で貯蔵されそして送達される。その状態においては、該ホルモンの高濃度の微量環境により、貯蔵に際して良好な安定性が付与される。CTのような水溶性のペプチドを、選択された

内部容積濃度でカプセル化するリボソームの調製が次に検討されている。

ステロイドホルモンおよび抗炎症剤は、本発明で有用な他の重要なクラスである。代表的なステロイドには、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、およびチナステロンが含まれる。増進されたステロイドを含むリボソームは、該化合物を小胞を形成する脂質中に包含させることによって容易に処方される。ステロイドの1Hまたは5H注射部位からの放出速度は、薬剤の分配係数、および注射部位でのリボソームの安定性および注射部位からの移動により制御される。

1Hまたは5H部位からのゆっくりとした放出リボソームの運搬に運した他のタイプの化合物には、アンヘテラシンBのような抗生物質、シクロスポリンのような免疫抑制剤、およびドキソビシンのような抗腫瘍剤が含まれる。1985年9月27日に出版された共同出願の特許出願第781,395号「アンヘテラシンB/リボソーム組成物」には、安定なリボソームサイズに適合する形の(総脂質の20モルパーセントまでの)高いモル比のアンヘテラシンBを含む新規リボソーム組成物が開示されている。抗生物質または抗腫瘍剤の送達について特に有利な本発明の1つの特徴は、薬剤放出部位および最も高い薬剤濃度を選択する能力である。

(以下余白)

D. リボソームの調製

リボソームの調製には、多様な方法を用い得る。これらの方法に関しては、Szoka(1980)によって詳細な説明がなされている。ある好ましい方法では、不均一なサイズの多重ラメラ小胞(HLV)が調製される。この方法においては、脂質膜和性の遊離基(遊離ラジカル)保護剤を含む小胞形成脂質、およびもし適当なら、脂質膜和性の薬剤混合物を、適当な有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空または不活性気体下で乾燥させて脂質薄膜を形成させる。必要に応じて、この膜は第三ブタノールのような適当な溶媒に再び溶解し、次いで凍結乾燥させて、より容易に水和される粉末状のより均一な脂質混合物を形成させ得る。この膜は、水和媒体で覆って、攪拌することにより典型的には15~60分間かけて水和させる。得られるHLVのサイズ分布は、より激しい攪拌条件下で脂質を水和させることによって、より小さなサイズに変化させ得る。

ペプチドホルモンのような被包水溶性化合物を有するリボソームを形成させる場合、この化合物は最終的なリボソーム懸濁液中のリボソームの内部容積における所望の濃度で水和媒体に溶解させる。従って、例えば約1mg/mlの内部空間濃度でCTが被包されているリボソームを形成させるためには、水和媒体は1mg/mlのCTを含有する。この水和媒体は、約10~50mMの間の好ましい濃度で独特のキレート剤を含有するようにも調製し得る。実施例Iには、CTが被包されているHLVの懸濁液の製造方法を記述する。

リボソームの調製に対して優れた方法であって感熱性の被包材料を含むリボソームを調製するために用い得る唯一の方法は、通常の深さのフィルター、典型的には0.22ミクロンのフィルターを用いた濾過によるものである。この方法は、最初にリボソームのサイズを約0.2~0.3ミクロンまたはそれ以下に小さく調整している場合のみ、処理量が高く真確的な基準に基づいて実施し得る。

リボソームをこのサイズの範囲にまで小さくするのに有用な技術にはいくつかある。リボソーム懸濁液を浴中の音波処理またはプローブを用いた音波処理のいずれかで音波処理すると、サイズが約0.05ミクロンより小さな小単ラメラ小胞(SUV)への顕著なサイズ減少が生じる。均質化は、別の方法であって、剪断エネルギーによって大きなリボソームをより小さなものに断片化する。典型的な均質化法においては、HLVを標準的な乳剤ホモジナイザーに通し、選別されたリボソームサイズ、典型的には約0.1と0.5ミクロンの間のサイズが観察されるまで再循環する。同様の方法において、粒子サイズの分布は、通常のレーザービームによる粒子サイズ識別法でモニターし得る。

リボソームを小孔ポリカーボネート膜に通して押し出すことは、リボソームサイズを比較的良く規定されたサイズ分布へと減少させる効果的な方法である(Szoka 1978)。典型的には、所望のリボソームサイズ分布が達成されるまで、懸濁液を数回膜に通して循環させる。リボソームを連続的に、よ

もう一つの有利なリボソーム製造方法は、Szoka(1978)によって記述されている逆相蒸発法である。ここでは、有機溶媒または溶媒系中、小胞形成脂質の溶液を、油中水型乳剤と適合するような相対的容量で、被包されるべき材料の水溶液に添加する。次いで、この混合物を乳化し、有機相を除去することにより、水相が被包されている脂質単層構造より成る逆相脂質ゲルを調製する。このゲルは、水溶液に再懸濁させると、一般に逆蒸発小胞(RBV)と呼ばれている比較的大きなオリゴラメラ小胞の懸濁液を形成する。この方法は、高い被包効率、典型的には添加された全水溶性材料の約30~40%の効率を与える。従って、高価な薬剤、またはペプチドホルモンのようなペプチド化合物の被包に有用である。

使用する方法に関係なく、リボソーム調製は、好ましくは無菌リボソーム懸濁液になるような条件下で実施される。これは、この方法の間に従来の滅菌技術を用いることによって行われる。

B. リボソームのサイズ調整

最初のリボソーム調製が無菌条件下で行い得るとしても、一般的には遊離の薬剤を除去するために調製物を処理することが必要であり、このような処理は、一般に無菌的に実施することが困難な方法を包含している。従って、これらのリボソームが静脈口注射に使用し得るようになる前に、最終的な滅菌が要求される。

り小さな孔の膜に通して押し出し、リボソームサイズを徐々に減少させ得る。

F. 遊離の薬剤の除去

上述したRBV法のような最も効率の良い被包化法でさえ、水溶性化合物の最大被包化効率は約50%である。従って、初期段階のリボソーム懸濁液は、50%またはそれ以上の該化合物を遊離した(被包されていない)形で含む。被包化効率が約10~20%の間であるのが典型的な、上述のHLV法によって形成されたリボソーム懸濁液は、被包されていない材料の量がさらに多い。実施例Vで報告されている研究は、遊離の(被包されていない)ペプチドが、リボソームに被包された化合物については数時間から数日間であるのに比較して、1時間より早く注射部位から取り除かれることを示している。従って、注射部位からの急速な薬剤放出の効果を最少にするためには、注射された組成物中に存在し得る遊離の薬剤を除去することが重要である。

リボソーム懸濁液から被包されていない化合物を除去するのに有用な方法はいくつかある。ある簡単な方法では、懸濁液中のリボソームを高速度心分離によってペレット化し、遊離の化合物および非常に小さなリボソームを上清中に残す。別の方法では、限外濾過により懸濁液を濃縮し、濃縮されたリボソームを、薬剤を含まない代わりの媒体中に再懸濁することを含む。あるいは、より大きなリボソーム粒子を母

質分子から分離するためにゲル濾過を用い得る。

遊離の化合物を除去するさらに別の方法では、イオン交換分子ふるい、またはアフィニティークロマトグラフィーを利用する。ここでは、遊離した形の化合物とは結合するが、捕捉された形の化合物とは結合しない樹脂、あるいは被包されていない化合物に特異的に結合する、例えば抗生物質のような結合分子を付着させた担体を含むカラムにリボソーム懸濁液を通す。この方法は、樹脂を速やかに選択することにより、遊離の発熱因子を除去する際にも効果的であり得る。

遊離の薬剤を除去するための処理に続いて、リボソーム懸濁液を18投与または50投与で用いるのに望ましい濃度にする。これは、リボソームが、例えば遠心分離または膜外濾過によって濃縮されている場合には、このリボソームを過剰な量の注射液体に再懸濁すること、あるいは薬剤除去工程が懸濁液の全容量を増加させる場合には、この懸濁液を濃縮することを含む得る。次いで、この懸濁液は、上述のように濾過によって滅菌する。

C. リボソームの加工

第1図は、本発明のリボソーム組成物を調製するのに適したリボソーム加工の作業工程図である。図中の左側の作業工程は、捕捉された化合物を有するリボソームの無菌懸濁液を形成させる工程を示している。上で詳述した、これらの工程は、選択された捕捉濃度の化合物を含むリボソーム懸濁液を

生じさせないような量の化合物の存在下でリボソームを形成させることにより、最後の滅菌濾過工程を回避し得る。空のリボソームは、濾過のためにサイズを小さくしなくてよいので比較的大きなリボソームを添加することにより、化合物放出割合において、より大きなサイズに関連した効果を達成し得るのが重要な利点である。

第1図の右側に示した工程を考慮すると、空のリボソームを、必要に応じて処理し、より小さなリボソームを除去し得る。これは、例えば、容器中により大きなリボソームを固定し、固定されなかった材料を無菌的に除去することにより行い得る。あるいは、これらのリボソームは、さらに処理することなく、フィルター滅菌したリボソームに直接添加することにより、選択された平均脂質組成、サイズ、および濃度を有する最終組成物を調製し得るか、またはこれらのリボソームは、フィルター滅菌したリボソームに添加する前に、無菌条件下で、1ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって、そのサイズを調整し得る。

従って、上述の加工法は、(a)選択された捕捉化合物濃度を有し、(b)遊離の化合物をほとんど含まないか、または全く含まない、そして(c)選択された放出割合で、注射部位から、捕捉された化合物を放出させる平均のリボソームサイズ、濃度および組成を有する無菌リボソーム組成物の調製を可能にする。

まず調製することを包含する。次いで、最後 滅菌濾過を考慮して、この懸濁液は 0.2~0.3 またはそれ以下にサイズを縮小する。捕捉されていない薬剤を除去した後、この材料を所望の脂質濃度にし、濾過により滅菌する。

第1図の右側の列は、空のリボソームを調製する際に用いる平行した工程を要している。空 リボソームを調製する原理は、リボソームに被包された材料の、18または50注射部位からの放出割合が、(a)脂質組成、(b)平均リボソームサイズ、または(c)注射されたリボソームの全脂質量を変更することによって選択的に変化させ得るという発見に基づいている。これらのパラメーターと化合物放出割合の間の関係は、以下の第2節および実施例Ⅴ~Ⅶで詳述される。ここでは、上記部位に注射されたリボソームの大部分が、捕捉された化合物を含んでない場合でさえ、これらの効果が達成されるということに注目すれば十分である。すなわち、化合物放出割合に対する脂質の組成、サイズ、および量の効果は、空のリボソームおよび化合物含有リボソームに同じように影響を与えるリボソーム/リボソーム相互作用に依存するようである。

脂質の組成、サイズ、および量を変化させる方法としての空のリボソームの利点は、それらが最終的な滅菌濾過工程を必要とせずに無菌の形で調製し得ることである。主として、遊離の化合物を懸濁液から除去することが必要なために、リボソーム調製物の無菌性が損なわれることが思い出される。化合物が存在しないか、あるいは相対量の遊離した化合物を

2. 組成物の特性

A. 安定性

本発明のある有利な特徴は、リボソームに被包されることによってペプチドホルモンのような薬理学的化合物の安定性が増大することにある。特に、CTに対して見い出されているように、このような化合物が濃縮された形でより安定である場合には、リボソームに被包されることによって、この化合物は懸濁液中に安定な形で保存され得る。該懸濁液中では、この化合物は局所的な高濃度を有するが、全濃度は比較的低い。例えば、実施例Ⅱに報告されている研究によると、担体タンパクの存在下でさえ、遊離のCTは0.01mg/mlより1mg/mlの方が実質的により安定である。内部容量濃度は1mg/mlであるが、懸濁液濃度は0.01mg/mlで、ペプチドがリボソーム内に被包されている場合、このペプチドは高濃度CTの安定特性を示す。

リボソームの安定性は、脂質親和性の遊離基捕捉剤、例えば α -Tを少なくとも約0.3のモル比で含有させることにより向上する。さらに、組成物の安定性は、フェリオキサミンのような放熱的キレート剤を、リボソーム懸濁液中の遊離第二鉄の量より過剰のモル数で添加することにより達成され得る。CT/リボソームは、上記のように、サイズを調整され、遊離CTを除去する処理が施され、そして滅菌濾過され得る。得られた組成物は、(a)少なくとも約0.2モル%の α -Tを含

むリボソームの細胞水溶液、および例少なくとも約1mg/mlの濃度でリボソーム内に捕捉されたカルシトニンを含有する。遊離のCT濃度は、被包ペプチド 約10モル%より小さいことが好ましい。

リボソームに被包されることによってCT ようなペプチドホルモンが安定な希釈された形で保存されるという発見は、様々な他のペプチドやタンパクに適用される。例えば、この方法は、酵素を安定な希釈された形で保存するのに用い得る。

B. 脂質および被包化合物の放出特性

脂質および被包化合物のIN注射部位からのクリアランス(除去)の割合を実施例I~VIに報告されているように調べた。これらの研究の目的は2つある：(1)注射部位からの脂質クリアランスおよびペプチドクリアランスの間の関係を決定すること、および(2)ペプチド放出割合に影響を及ぼすリボソームの変数を調べることである。これらの研究は、モデルペプチド化合物としてCTを用いて行われたが、血流中に放出されるためにはリボソームの破壊が必要であるような、いかなる水溶性化合物にもこの発見を応用し得るということが認識される。

IN注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を追跡するために、トレーサー脂質として¹⁴C- 標識フェスファチジルエタノールアミン(¹⁴C-PE)を含むリボソームを実験動物の肢に注射した。トレーサー脂質の配置は、少なくとも

(約1ミクロン)を、注射されたリボソームに添加することによって増大させ得ることを示している。後者の結果は、脂質クリアランスが平均のリボソームサイズに関連した事柄効果によって支配されており、そして本発明のある局面に従い、より大きな空のリボソームを添加することによって、より小さなリボソームの放出特性を、制御する基礎を脂質クリアランスが形成していることを示している。

脂質クリアランスに対するリボソーム投与量の効果も実施例IVに報告されている。そこで考慮されているように、脂質クリアランスの半減期は、脂質のサイズまたは組成には無関係に、脂質投与量が増加すると共に2倍より大きく増大し得る。投与量が増加すると共にクリアランス割合が同様に2倍に増大することは、被包CTに対して見られる(実施例V)。興味あることに、同じサイズおよび投与特性を有するリボソームからの、脂質およびCTの放出割合を比較すると(実施例V)、注射部位からのCTクリアランスは、対応する脂質トレーサーのクリアランスよりも約2倍速い。この発見は、リボソームが不安定化され、それに被包された内容物を主に注射部位で放出すること、そして該部位からの脂質クリアランスが異なった、より緩慢な機構によって取り扱われるということを示唆している。

IN部位からの脂質およびCTのクリアランスに対する脂質組成の効果も調べられた。上で考慮され、実施例IVおよびVで報告されているように、負に荷電したリン脂質、例えばPCを

も70時間の試験期間にわたって、最低8つの時点で測定された。注射部位からトレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの累積(三角印)を第2図に示す。注射部位からのトレーサークリアランスのデータは、片対数図表としてプロットした場合、第3図で示されるように直線プロットとなり、これから脂質クリアランス半減期を計算し得る。この方法の詳細は実施例IIに与えられている。

実験動物にIN注射したリボソームからの放射線CTのクリアランスは、同様に以下のものであった。典型的な実験から得られた、注射部位からのトレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの累積(三角印)のプロットを第4図に示す。第5図に示されているCTクリアランスの片対数プロットを用いて、注射部位からのクリアランス半減期を計算した。保持されるCTの対数値と時間との間の直線関係は、脂質が注射部位から1次の速度論で除去されていくことを示している。注射部位から血流中への遊離のCTの急速なクリアランスもこの図に示されている。

脂質とCTのクリアランス割合に対するリボソームサイズの効果は、実施例IVのデータから明らかである。該データは、サイズが0.2ミクロンから約5ミクロンの範囲にわたるリボソームと、より大きなリボソーム(60~100%長い脂質クリアランス割合を示す)とを比較したものである。実施例VIのデータは、小さなリボソーム(約0.2ミクロン)からの脂質トレーサーのクリアランスが、より大きな非標識リボソーム

リボソームに添加すると、IN部位からの脂質および被包CTのクリアランス割合が著しく増大される。実施例IVで注目されるように、PC効果は、部分的には、PC含有リボソームに見られるような低減されたリボソーム濃度に関連し得る。

コレステロールは、約40%のモル比では、PC含有リボソームからの脂質クリアランスに対してほとんど効果を有さなかったが、中性のPCリボソームからのCT放出に対して著しい安定化効果一すなわち、より長いクリアランス半減期一を示した。CTは、同じサイズおよび脂質組成特性を有するリボソームから脂質トレーサーの約2倍の速さで除去されたことにより、リボソーム脂質が、被包化合物に作用する機構とは異なる、より緩慢な機構で注射部位から除去されることが確認された。

上の結果は、注射部位におけるリボソームからの被包化合物の放出が、リボソームのサイズ、投与量、および脂質組成の変化によって選択的に制御され得るということを示している。特に、本発明の方法を実施する場合、注射部位からの被包化合物の放出割合は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズおよび合計量によって制御される。本発明のある局面では、平均サイズおよび脂質量は、より大きな空のリボソームを、興味ある化合物が被包されている、より小さな濃縮被包されたリボソームに添加することによって選択的に増加する。

本発明によれば、化合物を含有するリボソームまたは空の

リボソームのいずれか、あるいは両方にコレステロールを添加することによって、より長い放出時間も達成し得る。被包化合物をより早く放出させるためには、さらに負に荷電した脂質、例えばPGを脂質的に含むようにリボソームを処方する。

3. 治療での使用

本発明のリボソーム組成物は、様々なリボソーム不透透性化合物を非経口的に投与するために有用である。ある重要な応用は、ペプチドホルモンまたは免疫促進剤を、数日間にかたまって制御された形で血中へ投与する際に用いることである。この組成物はペプチド放出の半減期を選択的に変化させることができ、数日までの選択された期間で放出させる。その時、ペプチドは、頻繁にではなく、また遊離のペプチドの注射を用いた場合に見られるように急激に変動することなく与えられる。さらに、従来提案されてきたリボソーム調製物を用いるよりも、より度合の高い制御が達成され得る。

インシュリンおよびCTは、今日、遊離の形で経常的に投与されるペプチドの例である。これらのペプチドは両方とも、本発明のリボソーム組成物中に、容易に取り込まれ、該組成物の注射によって、数日間にかたまって供給され得る。ホルモン供給の割合は、本発明の方法に従って、選択された平均のリボソームサイズ、量、および組成を用いることによって制御される。いくつかのペプチド、例えばCTに対して、リボ

ソーム組成物の付加された利点とは、安定性の増大が達成されることであり、これによりこの材料はかなり格納された形で長期間にわたって保存される。

以下の実施例は、本発明の構造および利用に関する一定の実施態様を記述するものであって、本発明をいかなる模式にも制限することを意図するものではない。

(以下余白)

実施例 I

CT/HLVの問題

卵ホスファチジルコリン(EPC) および卵ホスファチジルグリセロールは、Avanti Lipid (バーミンガム, AL) によって供給された。これらの脂質は、薄層クロマトグラフィーによって約99%純粋であると判定された。コレステロール(CS)およびα-トコフェロール(α-T)は、それぞれReChab Prop. Inc. (イリジャン, MN) およびSigma Chemical Co. (セントルイス, MO) から入手したが、両者の純度は約99%またはそれ以上であった。サケカルシトニン(sCT)は、Armour Pharmaceuticals, カンカキー, ILから提供されたものであり、sCTはクロラミンT法(McFarland)によって¹²⁵Iを用いて¹²⁵T-放射線照射された。

表Iに示される脂質組成物A～Eの1つを含む多量ラメラ小胞(HLV)が調製された。4つの小胞調製物における脂質成分のモル比を表Iに示す。表中の値は、各種の小胞調製物を形成する際に用いられた各脂質成分のマイクロモル比を表す。筋肉内注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を測定する研究では、小胞形成脂質もホスファチジルエタノールアミンの放射性ヨウ素標識脂質(125I-PB)トレーサーを含んでいた。このトレーサーを形成するために、卵ホスファチジルエタノールアミン(PBE)のp-ヒドロキシベンズアミドを、Abraによって述べられているように合成し、この化合物をGreenwoodによって述べられているように¹²⁵Iでヨウ

素標識化した。貯蔵品の比放射能は、PB1ナノモルあたり3.85×10⁴cpsであった。ヨウ素標識脂質は、全脂質が0.2～10マイクロモルの範囲の注射に対して1×10⁴cpsで取り込まれた。

表 I

組成物	EPC	PG	CS	α-T
A	99			1
B	94	5		1
C	49	5	40	1
D		99		1
E	59		40	1

HLVを形成するために、クロロホルム貯蔵液中の脂質組成物を試験管または丸底フラスコ中で混合した。クロロホルムをロータリーエバポレーターで除去し、この脂質混合物を1-ブタノールに溶解させた。次いで、ブタノール溶液をドライアイス/アセトンで凍結させ、1晩凍結乾燥させた。乾脂質を数mlのリン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.4)で水和させた。CT/HLVを扱う研究では、水和用緩衝液は、0.2～5 mg/mlの¹²⁵I-sCT、および sCTを含有した。

脂質膜は、室温で約15分間攪拌することにより水和され、約0.2～10ミクロンの範囲にわたる不均一なサイズを有するHLV懸濁液を形成した。小胞調製物は、選択された小孔サイズを有するポリカーボネート膜に通過して押し出すことによってサイズを調整した。全調製物は、1.0ミクロンのポリカー

ポネート膜に連して押し出し、約1ミクロンの（凝集前の）初期小胞サイズを有する小胞を製造した。より小さなサイズの小胞を形成する際には、サイズを調整した小胞を、さらに0.4ミクロンと0.2ミクロンの小孔サイズの膜に連続して通して押し出し、初期に0.2ミクロンサイズの範囲内のサイズを有する小胞を製造した。

被包sCTを含むHLVは、PBSで3回洗浄することによって、非リボソーム関連の遊離のsCTが除去された。これらの調製物は、リムルスアノーバ分解産物分析（Boehringer, Inc., セントルイス, MO）によって免疫因子の試験が行われた。

実施例II

リボソーム被包sCTの安定性

1.0mg/mlの被包sCTを含む組成物BHLVを実施例Iと同様に調製した。これらの小胞を1.0と0.4のポリカーボネートフィルターに連続して通して押し出し、PBS中で3回洗浄して遊離のsCTを取り除いた。これらのリボソームは希釈して終濃度を0.010mg/ml sCTとし、0.45mlの緩衝液の標準的な微細フィルターに通過させることによって滅菌し、そして無菌のHuseバイアルに分別した。0.5% BSAを含むPBS中に遊離のsCTを0.010mg/mlまたは1.0mg/mlのいずれかで含む緩衝液もバイアルに分別した。リボソームに被包されたsCT調製物および遊離のsCT調製物は、表IIでは、それぞれL-sCTおよびF-sCTと表されている。

表 II

試料	(sCT) (mg/ml)	濃度 (%)	時間 (日)	活性 (%)
1 F-sCT	0.01	4	128	27
2 F-sCT	1.0	4	128	100
3 L-sCT	0.01	4	128	100
4 L-sCT	0.01	4	215	100
5 F-sCT	0.01	87	43	40
6 F-sCT	1.0	87	43	100
7 L-sCT	0.01	87	43	100
8 F-sCT	1.0	87	98	61
9 L-sCT	0.01	87	98	62
10 F-sCT	1.0	37	7	62
11 L-sCT	0.01	37	7	74

最初の3行は、F-sCTの希釈液と濃縮液およびL-sCTの希釈液の4つにおける128日間の安定性を比較したものである。明らかに、希釈F-sCTは、この期間にその活性の大部分を失うが、L-sCTは失わない。リボソーム安定化効果は、おそらくリボソームの被包空間内における局所的に高濃度のsCT(約1mg/ml)によるものである。第4行からわかるように、希釈液中の被包sCTは少なくとも215日間安定である。

同様のリボソーム保護効果は、室温でインキュベートされたsCTに見られる。43日のインキュベーション期間で、F-sCTの希釈液は、その活性の約60%を失ったが、濃縮F-sCT調製物および希釈L-sCT調製物は失活を示さなかった。後者の2つの調製物が大体同じ安定性を有することは、室温で98日間インキュベートしたデータ、および37℃で7日間インキュベートしたデータから明らかである。

F-sCT調製物およびL-sCT調製物の安定性は、上記バイアルを4℃、室温(約24℃)、および37℃のいずれかでインキュベートし、そして所定期間インキュベートした後にsCT生物活性を分した後、試験した。試料は、Sigma(セントルイス, MO)から入手した0.5%トリトン-X中で溶解させ、0.5%BSAを含むPBS1mlあたり40mUおよび120mUに希釈した。凍結した標準F-sCTのアリコットを同様に処理した。

各試料は8匹のラットで試験したが、4匹のラットには10mUのsCT(0.25mlの40mU/ml溶液)を、4匹のラットには30mU(0.25mlの120mU/ml溶液)を皮下投与した。対照ラットには、0.25mlのPBS/BSAを投与した。注射して正確に60分後、血液試料を各ラットから採取した。これらの血液試料は、凝固させて血清試料を遠心分離によって採集した。血清中のカルシウムレベルはSigma Chemical Co. (セントルイス, MO)によって供給されたキットを用いて、色素結合分析により測定した。これらの試料の低カルシウム活性は、注射の60分後に、標準曲線から決定した。結果は、各データ値に対する4匹のラットの平均値として表され、表IIに与えられている。

(以下空白)

実施例III

1H注射部位からの脂質クリアランス

ここで報告される研究は、実験室ラットにおける筋肉内(1H)注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を調べたものであり、脂質クリアランスの割合は放射性脂質トレーサーによって測定した。実施例Iの脂質組成物A-Dの1つを有するHLVを、0.2、2、または10マイクロモル脂質の選択された投与量で動物に注射した。

重量95~110gの雄SDラットを軽度エーテルで麻酔し、0.2マイクロモルの脂質を含む20μlを前肢に注射するか、あるいは2~10マイクロモルの脂質を含む100μlを各ラットの後肢に注射した。18匹のラットを各実験に用いた。ラットのうち2匹を代謝ケージに入れ、尿および糞便中への放射能の排泄をモニターした。試験期間が70時間から6日間にわたる各実験について、8つの時点を設定した。この8つの時点は、典型的な実験に対する第1図および第2図に明らかであるが、1H部位からの脂質クリアランスの半減期が、注射後の時間に対する残留放射能の片対数プロットによって決定し得るように選択した(第2図)。各時点では、2匹のラットを血液採取のために麻酔した。2mlの血液を採取し、¹⁴Cの放射能を計数した。次いで、これらのラットはCO₂チューンバー中で窒息死させ、注射した肢を解剖して放射能を計数した。尿と糞便は、実験の間に代謝ケージ中の2匹の動物から採集した。これらの2匹の動物も殺したが、これが最後の時

点となる。そしてまた、計数するために甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、腸、および生殖系を解剖した。残った胴体は、計数前に分解した。放射能レベルを測定し、実験期間の終わりにおける、これらの動物中の残留脂質トレーサの配置を決定した。

典型的な実験の結果を第2図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位(肢部)において保持された放射能を示し、投与された初期脂質投与量の百分率で表されている。誤差の棒線は、各時点における2匹の動物間の幅を表す。明らかなように、注射部位からのクリアランスの半減期は、約40~50時間の間にあり、(次節で考察される)第3図に示すようにデータを片対数プロットすることによって決定される。

尿および糞便中に測定された異種放射能レベルは、図中の黒い三角形で表される。この実験における70時間の試験期間の終わりで、全身放射能は、投与された初期投与量の約72%である。残りの計数は、肢(約5%)、胴体(約20%)、および器官(約3%)に分布している。器官に局在している、約3%の残りの放射能のうち、約55%は腸に、約34%は肝臓に、そして脾臓、尿管、腎臓、胃、心臓、肺、および生殖系の各々には約8%より少なく見出される。

実施例IV

1H注射部位からの脂質クリアランスに対する

リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成の効果

1Hリボソーム注射部位におけるトレーサ脂質の保持は、該部位からのトレーサクリアランスの半減期によって測定されるが、リボソームサイズ、組成、および脂質投与量の関数として調べた。クリアランスの半減期は、実施例Iで述べたように、雄ラットの注射された肢における放射能減少を、少なくとも70時間の期間にわたって追跡することによって計算した。各実験から、第2図の黒丸の曲線のような曲線が得られた。この曲線は、時間と共に注射部位の放射能が減少することを示している。

第3図の上方の点線は、時間の関数として片対数プロットで表された同じデータを示す。このプロットから、注射部位からの脂質クリアランス半減期は、容易に決定され得る。特定の実施例では、半減期(この時点では、脂質が50%保持されている)は48時間である。半減期のデータは、各実験に対する片対数プロットの傾きから決定され以下の表目に示す。

リボソームサイズは、表目に示すが、これらのサイズは、HLVをサイズ調整する際に用いたポリカーボネート膜の小孔サイズ、および実際のHLVの平均サイズによって表されている。HLVの平均サイズは、Elcompの粒径分析器(モデル200)によって測定し、標準化されたラテックスビーズで校正した。このようにして、例えば第1行目の注射されたHLVは、1ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって調整されたが、その測定された平均の粒子サイズは約3.2ミクロンを示した。押し出されたサイズと測定されたサイズの

不一致は、おそらくリボソームの濃度を反映するものであり、リボソーム濃度が高い場合、主として組成物AおよびBのHLVにおいてのみ生じる傾向がある。これらのHLVは負に帯電した脂質(PG)を含んでいない。

ラットに投与される投与量は、注射ごとに20μlまたは100μlあたりのマイクロセル脂質によって測定された。表中の投与量の欄に示した値は、注射ごとの全投与量である。

表II

№	組成物	サイズ(μM) 押出値	測定値	注射ごとの投与量 (μM/μl)	1-1/2 (日)
1	A	1.0	3.2	0.2/20	48.7
2	A	1.0	3.2	2/100	57.6
3	A	1.0	5.4	10/100	110.7
4	B	0.2	0.23	0.2/20	17.8
5	B	1.0	1.3	0.2/20	33.3
6	B	1.0	1.0	10/100	62.2
7	C	0.2	0.25	0.2/20	15.3
8	C	1.0	1.1	0.2/20	26.8
9	C	1.0	1.0	10/100	69.4
10	D	1.0	0.9	10/100	17.7

第1列~第3列のデータは、1H部位からの脂質クリアランスに対する全脂質投与量の効果を表す。明らかなように、注射された脂質量が約0.2マイクロセルから10マイクロセルに増加すると、クリアランスの半減期が約2倍増大する。同じ効果は、組成物BのHLV(第5列と第6列)および組成物CのHLV(第8列と第9列)に見られる。

半減期のデータは、脂質クリアランスの割合が大きなりボ

ソームサイズによって著しく増加することも示している。この効果は、第4列と第5列、および第7列と第8列から明らかである。これらの両者は、それぞれ0.2ミクロンと1.0ミクロンのフィルターを通して押し出されたHLVのクリアランス割合を比較したものである。大きなリボソームは、クリアランス半減期を約60~100%だけ増加させた。組成物AのHLVに観察された比較的大きいクリアランス割合は、少なくとも部分的には、レーザー粒径分析によって測定される。これらのHLVのサイズが比較的大きいことを反映し得る。第2図に片対数プロットを示す。この図から、第1列の半減期(点線)および第4列の半減期(実線)が計算された。

第1列を第4列および第7列(投与量レベルの0.2/20)、そして第3列を第6列および第9列(投与量レベル10/100)と比較すると、クリアランス割合に対する負に帯電したリン脂質(PG)の顕著な効果が示されるが、コレステロールの存在による効果はほとんどない。上で示唆したように、PGの効果は、少なくとも部分的には、PG含有リボソームで観察された小さなサイズによるものであり得る。しかしながら、EPG HLVに対して測定された半減期(第10列)は、5モル%または10モル%PGのいずれかを含有するHLV(それぞれ、第6列または第9列)と比較すると、リボソームサイズに関係するようには見えないPG濃度の強い効果を示している。

実施例V

IH注射部位からの α CTクリアランスに対する

リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成物の効果

筋肉内(IH)注射部位からのリボソームに被包された α CTのクリアランス割合は、実施例IIで述べた手順と同様の手順により、注射部位における 125 I- α CTの量を測定することによって決定された。実施例Iで述べた脂質組成物A、B、DおよびEの1つを有するHLVを、0.2、2または10マイクロモル脂質の選択された投与量で動物に注射した。これらのHLVには、約0.5 μ gの α CTが被包されており、 125 I-CTの比放射能は約 1×10^5 cpm/0.5 μ gであった。遊離の α CTは、リボソーム懸濁液から遠心分離によって取り除いた。注射後、70時間～8日間の試験期間にわたる間隔のある時点で一対の動物を殺し、これらの動物の注射された肢、および数多くの器官における放射性 α CTの保持を、上の実施例IIで述べたように測定した。注射された動物のうち2匹は、試験期間中の尿および糞便による α CTの排泄をモニターした。

典型的な実験の結果を第4図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位における 125 I- α CTの保持を表し、中間の曲線(三角印)は、試験期間中に動物によって排泄された累積放射能を表す。明らかに、初期に注射された α CTの約70～80%は、この実験の70時間後に排泄される。血流への α CTの脂質クリアランスは、下方の曲線(四角印)によって示される。

組成物の顕著な効果も表している。HLV中(組成物BおよびD)にPGが存在すると、トレーサー脂質に対して見出されたことと同様に、投与量が等しい2つのPG非含有HLV(組成物AおよびE)よりもクリアランス割合が非常に小さくなった。また、PG非含有脂質にコレステロールを添加すると、 α CTのクリアランス割合が著しく増加した。これは、第2列と第6列、および第3列と第7列を比較すると明らかである。ここで、第2列と第6列は投与量2/100に関し、第3列と第7列は投与量10/100に関する。

IH投与された調製物とSQ投与された調製物のクリアランス半減期が同程度であるということに注目しなければならない。例えば、クリアランスのIH半減期が20.8時間および9.7時間である調製物のSQ半減期は、それぞれ19.4時間および8.3時間である。

以下の表Vは、脂質トレーサーに関して、表IVの α CTクリアランス割合の少しと、表IIの対応する割合を比較したものである。興味あることに、すべての脂質組成物、および比較データを利用し得る投与量に対して、 α CT割合は脂質トレーサーの約半分である。この発見は、リボソームが不安定化され、その被包成分を主に注射部位で放出し、そして注射部位からの脂質クリアランスが、異なる、より緩慢な機構によって取り扱われることを示唆している。

(以下省略)

α CT保持 データを第5図に示すように片対数形式でプロットすると、結果は直線プロットになる。このプロットから、クリアランス半減期が決定される。図に示した例では、半減期は約8時間である。調べた4つの脂質組成物および2つの脂質投与量に対して、このように測定された半減期データは、以下 表IVに与えられている。すべての研究において、HLVは、あらかじめ1.0の小孔ポリカーボネート膜に通して押し出すことによってサイズが調整されているが、さらに小孔が小さい膜に通して押し出されなかった。

No.	組成物	表 IV	
		投与量 (μ moles/vol)	T-1/2
1	A	0.2/20	21.3
2	A	2/100	25.9
3	A	10/100	55.4
4	B	0.2/20	11.7
5	D	10/100	8.4
6	E	2/100	47.7
7	E	10/100	65.8

第1列～第3列のデータ、および第6列～第7列のデータは、IH部位からの α CTクリアランスに対する全脂質投与量の効果を示している。トレーサー脂質のクリアランスに対して観察されたことと同様に、0.2～10マイクロモル脂質の範囲にわたって全脂質投与量が増加すると、 α CTのクリアランス半減期が2～3倍増加した。

これらのデータは、 α CTのクリアランス割合に対する脂質

組成物	投与量 (μ moles/vol)	表 V	
		クリアランス α CT	T-1/2 脂質
A	0.2/20	21.3	48.7
A	2/100	20.8	57.6
A	10/100	55.4	110.7
B	0.2/20	11.7	33.3
D	10/100	8.4	17.7

実施例VI

小さなHLVからの α CT放出に対して添加された空のリボソーム

BPC: α -Tを99:1で、かつ被包された 125 I- α CTを含む逆相発小胞(REV)を標準的なREV手順(Szoka)に従って調製した。これらの小胞は、0.4 μ mおよび0.2 μ mのポリカーボネートフィルターに通して押し出し、被包されていない α CTは、遠心分離を行い、PBS中で3回洗浄することによって小胞懸濁液から取り除いた。次いで、調製物は0.22ミクロンの逆相フィルターに通して透過した。

同一組成の空のHLVを調製し、実施例Iで述べたように無菌条件下で1 μ mのフィルターに通して押し出した。REVを1:50のモル比でHLVと混合し、各IH注射が10マイクロモルの全脂質中に約 1×10^5 cpmの 125 I- α CTと約0.5 μ gの α CTを含むようにした。リボソームの混合物は注射前に1晩放置して平衡させた。実施例IIで述べられたように、リボソーム混合物またはREVをラットに皮下注射した。注射部位からの 125 I-放射能のクリアランスは、実施例IIで述べたように、

特表昭 63-502117 (13)

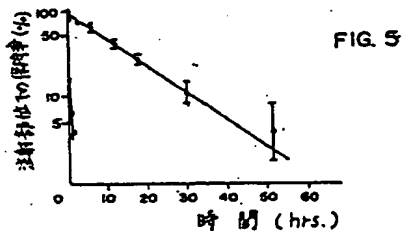
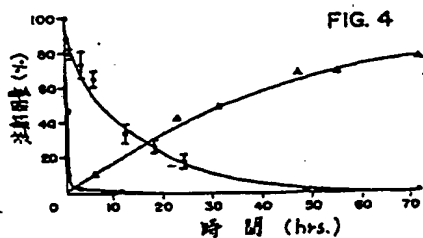
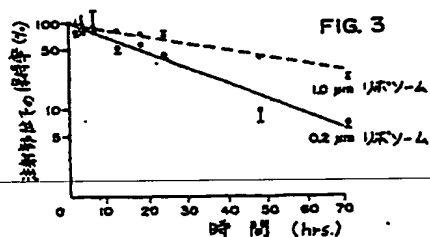
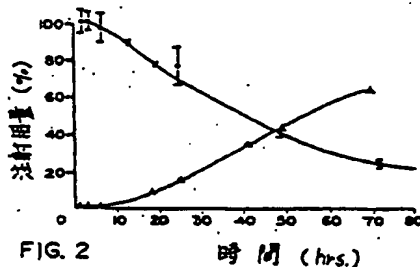
組成物	リボソームの種類	投与量 ($\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$)	半減期
-----	----------	---	-----

A	REV	0.2	7.2
A	REV + HLV	10.0	41.9
A	HLV	10.0	55.4

```

graph TD
    A[リボソーム素の形成] --> B[0.2ミクロンにサイズ調整]
    B --> C[遊離素の除去]
    C --> D[減圧濾過]
    D --> E[合併]
    F[大のリボソームの形成] --> G[トリボソームの除去]
    G --> H[合併]
    I[Xミクロンにサイズ調整] --> H
    E --> J[最終製品]
    H --> J
  
```

FIG. 1

[illegible]

Attachment to Form PCT/ISA/210, Part I.

INT. CL⁴: 301J 13/02; 332B 5/16, 9/02, 9/04

International Searching Authority PCT/US87/00285

7	Chemical Abstracts, Volume 99, No. 7, issued 15 August 1983 (Columbus, Ohio, USA); Kang et al., "Decreasing the intracellular uptake of liposomally entrapped substances by prior injection of empty liposomes", see page 305, column 1, the Abstract No. 580040, INCIS Med. Sci. Lib. Coopend. 1983, 11(9), 420-1 (Eng).	All
<input checked="" type="checkbox"/> EXAMINATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNPATENTABLE <small>This International Search Report has not been prepared in respect of certain claims under Article 17B(2) of the following conditions:</small> <input type="checkbox"/> Claim number because they relate to subject matter not considered to be patentable by this Authority, namely:		
<input type="checkbox"/> Other number because they relate to some of the International publications that do not comply with the procedural requirements in force at the time that the International Search Report was prepared, namely:		
<input checked="" type="checkbox"/> EXAMINATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <small>This International Searching Authority found multiple inventions in the International application as follows:</small> <input type="checkbox"/> As if separate additional search fees were timely paid to the Authority, the International Search Report would contain all inventions claimed in the International application. <input type="checkbox"/> As only some of the inventions claimed in the International application were timely paid to the Authority, the International Search Report contains only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:		
<input type="checkbox"/> As separate additional search fees were timely paid to the Authority, respectively, the International Search Report is submitted to the International Searching Authority in the following order:		
<input checked="" type="checkbox"/> As if separate additional search fees were timely paid to the Authority, respectively, the International Searching Authority and the Applicant are invited to:		
<input type="checkbox"/> The International Searching Authority to examine the International application as a whole. <input type="checkbox"/> The International Searching Authority to examine the International application as to:		

Form PCT/ISA/210 (Supplementary sheet) (22 July 1986)